

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl.
H01M 8/16(11) 공개번호
(43) 공개일자특1998-016777
1998년06월05일

(21) 출원번호 특1996-036468
(22) 출원일자 1996년08월29일
(71) 출원인 한국과학기술연구원, 박원훈
 대한민국
 136-791
 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1
 박두현
 대한민국
 139-206
 서울특별시 노원구 상계6동 한보미도아파트 103동 312호
(72) 발명자 김병홍
 대한민국
 130-082
 서울특별시 동대문구 이문2동 264-44 삼익주택 30호
(51) Int. Cl.
H01M 8/16
(21) 출원번호 장인섭
 대한민국
 138-222
(22) 출원일자 서울특별시 송파구 잠실2동 주공아파트 204-106호
(71) 출원인 박두현
 대한민국
 139-206
 서울특별시 노원구 상계6동 한보미도아파트 103동 312호
(74) 대리인 김성택
 주성민
(77) 심사청구 있음
(54) 출원명 금속염 환원 세균을 사용한 생물연료전지

(72) 발명자
요약

본 발명은 전자 전달 매체 없이 전극 반응을 하는 금속염 환원 세균을 이용한 생물 연료 전지를 제공한다. 본 발명에 따른 금속염 환원 세균은 발효 대사에서 발생하는 환원력을 전자 대사를 통해 세포 외부에서 소비하므로, 폐수에 함유되어 있는 유기물과 무기물을 연료로 이용하여 전류를 발생시킬 수 있다. 본 발명에 따른 금속염 환원 세균을 이용한 연료 전지에서 약 30 mM의 젖산염이 아세트산으로 산화될 때 최대 0.42 V, 1.15 mA의 전기 에너지가 발생하였다. 연료 전지의 효율은 촉매로 사용하는 균체량과 유효 전극 면적을 증가시킴으로써 향상되었다.

(74) 대리인
대표도

도2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 흑연 막대를 전극으로 사용하고 양극과 음극을 미세 유리 입자 소결막으로 연결한 연료 전지의 개략도.

도 2는 흑연 부직포를 전극으로 사용하고 양극과 음극을 양이온 교환막으로 연결한 연료 전지의 개략도.

도 3은 본 발명에 따른 금속염 환원 세균 표준 균주의 전극 반응에 의한 순환 전압 전류 그래프.

도 4는 젖산염을 연료로 사용한 본 발명의 생물 연료 전지에서 생산된 전류량을 나타낸 그래프.

도 5는 수소를 연료로 사용한 본 발명의 생물 연료 전지에서 생산된 전류량을 나타낸 그래프.

도 6은 피루브산염을 연료로 사용한 본 발명의 생물 연료 전지에서 생산된 전류량을 나타낸 그래프.

도 7은 아세트산염, 수소 및 시트르산염 각각을 연료로 사용한 본 발명의 생물 연료 전지에서 생산된 전류량을 비교한 그래프.

도 8은 본 발명의 생물 연료 전지에서 생산된 전류량과 기질 전환율을 나타낸 그래프.

도 9는 본 발명의 생물 연료 전지에서 전지의 효율을 향상시키기 위해 실시한 실험에서 생산된 전류량과 기질 전환율을 나타낸 그래프.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 전자 전달 매체를 사용하지 않는 생물 연료 전지에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 대사 과정에서 발생하는 환원력을 세포 표면을 통해 소비하는 미생물을 사용함으로써 유기물이 산화될 때 발생하는 환원력을 전기 에너지로 직접 전환시킬 수 있는 생물 연료 전지에 관한 것이다.

생물 연료 전지는 생물 또는 그의 일부를 사용하여 생물의 에너지 대사에서 발생하는 환원력을 전기 에너지로 전환시키는 장치로서, 미생물 연료 전지에서는 촉매로서 작용하는 미생물이 기질을 산화시킬 때 발생하는 환원력을 전기 에너지로 전환시키기 위해서 에너지 대사에서 발생하는 전자가 미생물로부터 전극으로 전달되어야 한다. 그러나, 미생물을 포함하는 모든 생물의 세포는 막으로 싸여 있으며, 이러한 막은 비전도체인 지질로 구성되어 있기 때문에 미생물과 전극간의 직접적인 전자 교환은 이루어질 수 없다. 따라서, 미생물 균체를 촉매로 사용할 때에는 적당한 전자 전달 매체를 사용함으로써 생물과 전극간의 전자 전달이 쉽게 이루어지도록 하여야 한다.

롤러(Roller) 등은 반응 촉매로서 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*), 대장균(*Escherichia coli*), 알칼리젠시스 유트로퍼스(*Alcaligenes eutrophus*), 아조토박터 크로오코쿰(*Azotobacter chroococum*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 슈도모나스 에어루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 등을 사용하고, 전자 전달 매체로서는 티오닌(thionine), 메틸렌 블루, 브릴리언트 크레실 블루(brilliant cresyl blue), 벤질 비올로겐(benzyl viologen) 등을 사용하여 구성된 생물 연료 전지에서, 산소 소비량으로 비교한 생물 연료 전지의 효율은 사용한 균체와 전자 전달 매체의 종류에 따라서 큰 차이가 있음을 확인한 바 있다[참조: Roller et al., 1984, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 34B: 3-12]. 또한, 포도당을 연료로 사용한 생물 연료 전지에서 산소 소비량(기질 소비량)과 전자 전달 매체의 환원 능력이 가장 우수한 균체는 대장균과 프로테우스 불가리스(*Proteus vulgaris*)임을 확인하였다[참조: 상기 Roller 등의 문헌].

전자 전달 매체를 사용하는 생물 연료 전지의 경우, 균체의 기질 소비 효율, 전자 전달 매체의 환원 능력, 전자 전달 매체의 전극과의 반응성 등은 생물 연료 전지의 효율을 결정하는 중요한 인자이다. 또한, 전자 전달 매체의 산화-환원 전위에 따라 미생물의 에너지 대사에 미치는 영향이 다르게 나타나므로, 촉매로서의 미생물 균체 활성의 지속성 또한 매우 중요하다.

이와 관련하여, 로빈(Robin) 등은 생물 촉매로서 45 mg의 프로테우스 불가리스(*P. vulgaris*)를, 전자 전달 매체로서 0.5 mM의 하이드록시나프토 퀸온(HNQ)을, 그리고 연료로서 20 LM의 포도당을 사용하여 0.5 mA, 0.7 V의 기전력을 갖는 생물 연료 전지를 구성하였다[참조: Robin et al., 1993, Applied Biochemistry and Biotechnology 39/40:27-40]. 베네토(Bennetto) 등은 설탕을 연료로 사용하고, 프로테우스를 촉매로, 그리고 티오닌을 전자 전달 매체로 사용한 연료 전지를 구성하여 최고 44 C(Coulomb)의 전류를 생산하였다고 보고하였다[참조: Bennetto et al., 1985, Biotechnology letters, 7:699-704].

한편, 하버만과 포머(Harberman and Pommer)도 전자 전달 매체 대신 산화코발트, 몰리브덴/바나듐 합금 등을 전극으로 사용하여, 폐수 중 황산염 환원 세균이 생산하는 황화수소를 연료로 이용하는 연료 전지를 구성하여 매 당 150 mA(150 mA/cm²)의 전류를 생산하였다고 보고한 바 있다[참조: Harbermann and Pommer, 1991, Applied Microbiology and Biotechnology 33: 128-133].

이상에서 알 수 있는 바와 같이, 지금까지 연구된 생물 연료 전지는 필수적으로 인공 전자 전달 매체 또는 황산염을 전자 전달 매체로 사용해야 한다는 문제점이 있다. 그러나, 생물 연료 전지에 사용되는 인공 전자 전달 매체는 연료 전지의 효율을 증가시키는 반면, 독성, 환경 오염, 미생물 균체에 미치는 불리한 영향 등으로 인해 사용량이 제한될 뿐더러 사용후 처리에 있어서도 문제점이 있다. 또한, 인공 전자 전달 매체를 사용하지 않는 경우일지라도, 미생물의 환원성 대사 산물(황화수소)이 전자 전달 매체로서 이용되어야 하기 때문에, 연료 전지를 구성할 때 황화수소에 의해 부식되지 않는 특수한 금속을 전극으로 사용해야 하는 문제점이 있어 왔다.

한편, 혐기성 생태계에서 제2철 이온은 미생물에 의해 생산되는 황화수소 등의 작용으로 무생물적 반응에 의해 환원되는 것으로 오랫동안 알려져 왔으나, 최근 제2철 이온을 전자 수용체로 이용하여 생장하는 많은 종류의 세균이 순수 분리되면서 제2철 이온의 환원 반응이 특정 미생물에 의해 이루어진다는 것이 증명되었다. 제2철 이온 이외에도 4가의 망간, 6가의 우라늄, 6가의 몰리브덴 등을 전자 수용체로 이용하는 혐기성 세균이 분리되었으며, 이들을 통칭하여 금속염 환원 세균이라 한다.

이러한 금속염 환원 세균이 기질로 이용할 수 있는 물질은 아세트산, 젖산, 피루브산, 프로피온산, 발레르산, 알코올 등의 지방족 화합물과 톨루엔, 페놀, 크레졸, 벤조산, 벤질알코올, 벤즈알데히드 등의 방향족 화합물 등이다[참조: Lovley and Klug, 1990, Applied and Environmental Microbiology 56: 1858-1864]. 금속염 환원 세균의 일부는 젖산 등을 아세트산까지 산화시키고 다른 종류의 세균은 아세트산을 이산화탄소까지 산화시키는데, 이때 발생하는 환원력을 금속염 환원 반응에 이용한다. 전자를 불완전 산화균, 후자를 완전 산화균이라 한다.

산소의 농도가 극히 낮은 환경에서 생육하는 혐기성 세균은 에너지 대사의 특성에 따라 발효 세균과 호흡 세균으로 분류된다. 발효 세균은 단백질과 같은 고분자 화합물을 유기산으로 분해하고, 호흡 세균은 적당한 전자 수용체의 환원 반응을 이용하여 발효 산물을 완전히 분해한다. 일반적으로, 하나의 계에 여러 종류의 미생물이 혼재 생존하는 경우, 상대적으로 많은 양의 에너지를 생산할 수 있는 대사 체계를 보유하고 있는 미생물이 우세하게 된다. 혐기성 호흡 세균이 유기물을 산화시킬 때 이용할 수 있는 전자 수용체는 산화제2철[Fe(III)], 질산염, 이산화황, 황산염, 탄산염 등이 있으며, 동일한 전자 공여체의 산화 반응에서 발생된 환원력에 의해 가장 많은 에너지가 생산되는 경우는 산화제2철[Fe(III)]이 환원될 때로서, 질산염, 황산염, 탄산염의 순으로 낮아진다고 알려져있다[참조: 김병홍, 미생물생리학, 아카데미서적, 1995]. 산화제2철이 산화제1철로 환원되는 반응의 환원 전위는 0.78 V로 산소가 물로 환원될 때의 환원 전위 0.82 V와 매우 유사하다.

금속염 환원 세균이 이용하는 전자 수용체 중 제2철 이온 등 일부는 물에 대한 용해도가 극히 낮다. 제2철 이온을 이용하는 시와넬라 푸트레파 시엔스(*Shewanella putrefaciens*)의 한 균주는 전자 수용체를 세포내로 운반하지 않는 대신 세포 외막에 사이토크롬(cytochrome)을 보유하고 있으며, 세포 안에서 유기물의 산화로 발생된 환원력을 세포 밖으로 운반하여 제2철 이온을 환원시키는 것으로 알려져 있다[참조: Myer and Myer, 1992, Journal of Bacteriology 174: 3429-3438].

한편, 생물의 산화-환원 반응에 관여하는 많은 종류의 단백질이 전기 화학 장치의 전극과 전자를 직접 교환할 수 있는 것으로 알려져 있다[참조: Harmer and Hill, 1985, Journal of Electroanalytical Chemistry 189, 229-246; Moreno et al., 1991, European Journal of Biochemistry 202, 385-393]. 이 때, 전자의 교환은 전극 표면과 단백질 중 금속 이온 부분인 헴(heme) 등이 직접 접촉하기 때문에 가능한 것으로, 단백질 부분과 이 두 전자 전달체 사이에 위치하면 전자의 이동이 이루어지지 않는다. 제2철 이온 환원 세균의 세포 외막에 있는 싸이토크롬의 경우, 세포 안에서 공급되는 전자를 불용성의 전자 수용체로 전달할 수 있도록 배열되어 있기 때문에 전극 반응이 쉽게 일어나는 것으로 생각된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 이제까지의 생물 연료 전지에 있어서의 상기한 문제점들을 극복하고자 인공 전자 전달 매체를 사용하지 않고서도 효율적인 전극 반응을 할 수 있는 금속염 환원 세균을 분리해내고, 이를 사용한 신규 생물 연료 전지를 개발하였다.

본 발명은 특히 폐수 중에 함유되어 있는 유기물과 무기물을 연료로 이용하는, 전자 전달 매체를 사용하지 않는 생물 연료 전지를 제공하기 위한 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 양극과 음극, 이들 양극 및 음극의 전도 매체, 이들 두 극 사이의 이온 교환막 및 음극 부위의 미생물 촉매로 이루어진 생물 연료 전지에 있어서, 미생물 촉매로서 금속염 환원 세균을 사용함을 특징으로 하는 생물 연료 전지를 제공한다.

본 발명에 따른 전지 구조는 통상의 연료 전지 구조로서 그 대표적인 예가 도 1 및 도 2에 간략히 도시되어 있다.

본 발명의 생물 연료 전지에 사용될 수 있는 양극 및 음극으로서는 통상의 생물 연료 전지에 사용되는 전극을 사용할 수 있다. 예를 들어, 흑연 전극을 사용할 수 있으며(도 1 참조), 전지 자체의 저항을 줄이고 유효 표면적을 증가시키기 위해 흑연 부직포(graphite felt)를 사용할 수 있다(도 2 참조). 또한, 연료 전지 자체의 저항을 극소화시키기 위하여 양극과 음극 사이를 양이온 교환막, 예를 들어, 미세 유리 입자를 소결하여 만든 이온 교환막을 사용할 수 있다.

양극의 전도 매체로는 통상적인 생물 연료 전지에 사용되는 전해질을 용해시킨 완충액, 바람직하게는 100 mM의 염화칼륨을 함유하는 100 mM의 인산염 완충액을 사용하고, 음극의 전도 매체로는 통상의 완충액, 예를 들어, 100 mM의 인산염 완충액을 사용한다. 시험에 사용된 모든 완충액의 pH는 7.0으로 조정하는 것이 바람직하다.

전지 구성시 양극의 전도 매체는, 예를 들어, 공기를 연속적으로 주입함으로써 산소 포화상태로 유지하고, 음극의 전도 매체는 혐기적 환경으로 유지시킨다. 음극 부위의 혐기적 환경은, 예를 들어, 가스 정제 오븐을 통과시켜 산소를 완전히 제거시킨 질소를 주입함으로써 용존 산소를 제거한 후 밀폐시켜 얻을 수 있다.

본 발명의 생물 연료 전지에 사용되는 미생물 촉매는 유기물 또는 무기물을 연료로 이용하여, 연료 소비에 따른 환원력을 별도의 전자 전달 매체의 도움 없이 음극전극 반응에 이용하여 전류를 생성시킬 수 있는 세균이다. 본 발명의 생물 연료 전지에 사용되는 미생물 촉매는 바람직하게는 폐수 중에 존재하는 다양한 유기 및 무기물을 발효시킬 때 발생하는 환원력을 군체 생산에 이용하지 않고 전극을 통해 소비할 수 있는 중온성 또는 고온성 세균이다.

이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

실시예 1>

이 실시예는 본 발명에 사용될 수 있는 금속염 환원 세균의 분리 과정, 그의 균학적 분류, 생리학적 특성 및 생물 연료 전지에 유리한 특성 등을 살펴보기 위한 것이다.

본 도양, 종량천 하저 토양, 하수 처리장의 혐기 소화조 등 다양한 환경에서 분리된 많은 종류의 미생물 가운데 젖산염을 전자 공여체(기질)로 이용하고 산화제2철을 전자 수용체로 이용하는 세균을 선택하였다. 토양, 침전물 및 오폐수로부터의 시료를 생리식염수에 현탁시킨 후 100만 내지 1000만배의 비율로 적절히 희석하였다. 이를 젖산염(30밀리몰), 제2철 이온(10 g/l) 등을 첨가한 탄산염 완충 용액 기본 배지의 고체 평판에 도말한 후, 25 °C의 절대 혐기성 환경에서 4 내지 5일 배양하였다. 균체 집락 가운데 검은 갈색을 띠는 것을 골라내어 젖산염, 제2철 이온을 함유하는 탄산염 완충 용액 기본 액체 배지에서 혐기적으로 배양하면서 1일 간격으로 생성된 제1철 이온을 정량하였다. 제1철 이온은 페로진(ferrazine) 발색 방법을 사용하여 정량하였다[참조: 박 두현, 임 시근, 김 병홍, 최 용호, 1996, 산업미생물학회지, Vol 24:364-370]. 제1철 이온이 생성되지 않은 배양관을 골라내어 오염 여부를 확인하고 저장하였다. 선택된 세균 균주들 중에서 제2철 이온의 환원력이 가장 우수한 균주를 IR-1으로 명명하였다. IR-1은 LB 한천 배지상에서 생육하는 구형·단균으로서 포자가 없고 운동성이 없는 그람 음성균(*Shewanella* sp.)이다. IR-1은 젖산염을 아세트산염으로 산화시켜 생육에 필요한 에너지를 얻으며 비교적 낮은 온도(25°C)에서 생육하였다. 본 발명자들은 본 출원과 관련하여 IR-1을 대한민국 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1 소재의 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 1996년 7월 24일자 로 기탁하고 수탁번호 KCTC 8753P를 부여받은 바 있다.

IR-1의 생장 및 대사 특성을 확인하기 위하여 전자 공여체와 전자 수용체의 종류에 따른 생장 수율을 다음과 같이 비교하였다. 즉, 탄산염 완충액 기본 배지[CBBM: carbonate buffered basal medium: NaCl 0.9 g/l, MgSO₄ 0.25 g/l, CaCl₂ 0.1 g/l, 효모 추출물 1 g/l, 인산염 10 mM, 미량 무기 원소 용액 10 ml/l(니트랄로트리아세테이트 1.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, CoCl₂·6H₂O 0.17 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, ZnCl₂ 0.1 g, CuCl₂·2H₂O 0.02 g, H₃BO₃ 0.1 g, Na-몰리브데이트 0.01 g, Na₂SeO₃ 0.017 g, NiSO₄·6H₂O 0.026 g, NaCl 1 g, 증류수 1000 ml)]에 각각 30 mM의 젖산염, 피루브산염 또는 수소-아세트산염 기질을 첨가하고 질산염 또는 제2철 이온을 전자 수용체로 이용하여 전자 공여체에 따른 생장 수율을 비교하고 그 결과를 하기 표 1에 나타냈다.

표 1]

전자 공여체와 전자 수용체의 종류에 따른 IR-1의 생장 수율

전자 공여체	전자 수용체	탄소원	생장수율 (기질당당 균체중 가장)	제이철환원량
젖산염	-		0	

피루브산			3.4	
주조	제이철이온	아세트산염/이산화탄소	0	1.1밀리몰
젖산염	제이철이온		3.3	3.5밀리몰
피루브산	제이철이온		3.9	3.5밀리몰
주조	질산염	아세트염/이산화탄소	9.7*	
젖산염	질산염		6.9	
피루브산	질산염		5.7	

*아세트산 소비량 대 g 균체량으로 계산하였음.

IR-1은 피루브산을 아세트산으로 산화시키면서 ATP를 생산하여 이를 에너지원으로 사용하여 생육한다. 균체내 젖산은 피루브산으로 산화된 다음 여러 대사 경로를 통하여 이용되는데, 피루브산을 연료(기질)로서 이용하는 경우 제2철 이온의 사용과 관계없이 균체 수율이 비슷하였으며 젖산과 제2철 이온을 사용한 실험에서도 비슷한 균체 수율을 보였다. 이러한 사실은, 상기 실험에서 세균이 생육하는 것은 피루브산의 대사에서 생성된 ATP에만 의존하며, 제2철 이온이 환원되면서 발생하는 에너지는 미생물의 생육에 이용되지 않음을 나타낸다. 이러한 결과는 IR-1이 제2철 이온을 전자 수용체로 이용하는 경우, 전자 대사(호흡)를 통해 ATP를 생산하지 못하기 때문에 발효 대사에서 생산되는 에너지를 이용하여 생육하는 것으로 나타났다.

한편, 수소를 전자 공여체로 이용하고 제2철 이온을 전자 수용체로 이용하는 경우 시험균은 전혀 생육하지 않았다. 이는 수소가 산화될 때 발생하는 환원력도 전자 대사를 통해 에너지 생산에 이용되지 못하고 세포 외부에서 제2철 이온을 환원하면서 소비되기 때문인 것으로 추측된다. 반면, 수소를 전자 공여체로 사용하고 질산염을 전자 수용체로 사용한 배지에서 시험균은 비교적 높은 생육 수율을 보였는데, 이는 금속염 환원 세균이 발효를 통해 기질을 산화하여 전자 대사에 필요한 환원력과 에너지(ATP)를 생산하기 때문이다. 금속염 환원 세균의 발효 대사에서 생산되는 환원력은 호흡에 이용될 때 적당한 전자 수용체를 환원시키면서 에너지의 생산에 이용되는데, 질산염이나 산소와 같이 세포막을 쉽게 통과할 수 있는 전자 수용체가 호흡 대사에 이용될 경우 많은 양의 에너지가 생산된다. 그러나, 표 1에서 보는 바와 같이 불용성의 제2철 이온이 전자 수용체로 이용될 경우 젖산염과 피루브산염에서 시험균의 생육 수율은 발효에 의한 생육 수율과 차이가 없었다. 이것은 제2철 이온이 전자 수용체로 이용될 경우 전자 대사에서 에너지가 생산되지 않는다는 것을 보여주는 것이다. 전자 수용체가 세포 외부에서 환원되는 경우 전자 대사에서 생산되는 양성자와 전자가 세포 외부에서 소비되기 때문에 양성자 구동력에 의한 에너지는 생산될 수 없기 때문이다. 따라서, 기질이 산화될 때 발생하는 에너지의 많은 부분이 세포 밖으로 소비되기 때문에 다른 세균과 비교하여 동일량의 균체를 생산하기 위하여 더욱 많은 유기물을 산화시켜야 할 것이다. 시험균의 에너지 대사에서 나타나는 이러한 특성은 전자 대사에 발생하는 환원력이 세포 외부로 소비되는 일종의 소비성 전자 방출(electron-sink) 현상으로 유기물의 산화 과정에서 유래한 전자가 일을 하지 않고 전극으로 전달되기 때문에 전극 반응 효율을 높일 수 있고, 미생물을 이용한 연료 전지에 매우 유용하게 활용될 수 있으며 폐수 내의 유기물 분해 효율을 증가시킬 수 있다.

이와 같이 외막에 위치하는 전자 전달 효소를 통하여 시험균의 에너지 대사에서 발생한 환원력이 세포 밖에서 소비될 수 있는지를 확인하기 위하여 균체와 전극과의 전기화학적 반응성을 순환 전압 전류 측정 방법(cyclovoltammetric method)을 이용하여 측정하였다. 순환 전압 전류 측정 방법을 전극 표면에서 특정 화학 물질의 산화-환원 반응에 관련된 정보를 제공하기 때문에 생물 연료 전지(biofuel cell)와 생물센서(biosensor) 등 다양한 연구 분야에 많이 이용되고 있다. 순환 전압 전류 측정을 위하여 기본적인 전기화학 전지(electrochemical cell)를 사용하였다. 주사 전압의 변화에 따라 균체와 전극 사이에서 발생하는 전류의 변화는 포텐시오스타트(potentiostat, BAS CV-27)를 사용하여 측정하였다. 시험균을 피루브산염을 함유하는 탄산염 완충액 기본 배지에서 3일간 혐기적으로 배양시킨 후, 원심 분리 방법으로 수확하였다. 이를 50 mM의 인산염 완충액으로 2회 세척하고, 같은 완충액에 균체 농도 0.7 g/l로 현탁하였다. 균체를 0.8% 글루타르알데히드와 17% 소 혈청 알부민을 사용하여 탄소 전극(직경 5 mm, 길이 10 mm)에 고정시켜 순환 전압 전류 측정에 이용하였다. 도 3은 전극에 고정시킨 시험균과 전극과의 반응을 순환 전압 전류의 변화로 나타낸 것이다. 도 3에서 보는 바와 같이, 시험균은 전극과 반응하여 싸이토크롬과 비슷한 형태의 전극 반응을 보였다. 이것은 본 실험에 사용된 시험균이 전극과 반응하여 전자를 직접 교환할 수 있기 때문에 생물 연료 전지의 촉매로서 이용될 때 전자 전달 매체를 배제할 수 있는 중요한 특징이다.

이와 같이 설명한 바와 같이, 금속염 환원 세균은 산화제2철 등의 불용성 물질을 전자 수용체로 이용하여 기질의 산화시에 발생하는 전자를 소비한다. 따라서, 에너지 대사에서 발생하는 환원력이 균체 생산에 이용되지 않고 제2철 이온의 환원 반응에 이용되기 때문에 동일한 양의 생육 에너지 생산하기 위하여 다른 종류의 혐기성 호흡 세균에 비해 훨씬 많은 양의 유기물을 분해하여야 한다. 산화제2철 대신 전극을 전자 수용체로 이용하면 미생물의 에너지 대사에서 발생하는 환원력은 균체 생산에 이용되지 않고 전극을 통해 소비될 수 있기 때문에 금속염 환원 세균이 폐수를 연료로 이용하는 생물 연료 전지에 이용될 경우 오니(sludge)의 발생량과 메탄 생산량이 감소되고 유기물의 분해 효율이 증가될 수 있을 것으로 기대된다.

2.3.2. 실험 시에 2>

이 실험 시에서는 시험균 IR-1을 사용하여 도 2에 제시한 형태의 연료 전지의 전류 생산성을 시험하였다.

양극과 음극의 전극으로서는 각각 유효 표면적 0.1775 m^2/g 및 0.1598 m^2/g 의 흑연 부직포를 사용하였다. 양극의 전도 매체로는 100 mM의 염산을 함유하는 100 mM의 인산염 완충액을 사용하고, 양극과 음극을 미세 유리 입자 소결막으로 연결하였다. 음극의 전도 매체로는 100 mM의 인산염 완충액을 사용하였다. 양극의 전도 매체에는 공기를 연속적으로 주입하여 산소 포화 상태를 유지하였으며, 음극의 전도 매체에는 연료 전지 구성 초기에 약 30분 동안 가스 정체 오븐을 통과시켜 산소를 완전히 제거시킨 질소를 주입하여 용존 산소를 제거한 후 밀폐함으로써 혐기적 환경을 유지하였다. 시험에 사용된 모든 완충액의 pH는 7.0으로 조정하였다. 연료 전지에서 생산되는 전류는 암페어미터를 사용하여 측정하고, 기록계를 사용하여 연속적으로 측정하였다. 연료 전지 자체의 저항은 52 $\text{k}\Omega$ 이었고, 암페어미터의 저항은 10 Ω 미만이었다.

이와 같이 준비된 연료 전지의 음극 부위에 50 ml 약 0.7 g의 시험균 IR-1을 채워넣고 혐기 환경을 유지하였다. 시험균은 30 mM의 젖산염을 함유하는 인산염 완충액 기본 배지에서 48 시간 동안 혐기적으로 배양한 후 원심 분리하여 수확하였다. 이를 50 mM의 인산염 완충액으로 2회 세척한 후, 100 mM 염화칼륨을 함유하는 100 mM의 인산염 완충액에 현탁시켜 실험에 사용하였다. 이와 같이 준비된 연료 전지에 30mM의 젖산염을 연료로서 첨가하고, 이 때 발생한 전류의 양을 기록계를 이용하여 측정하였다. 도 4에서 보는 바와 같이, 발생한 최대 전류량은 140 μA 였다. 이 실험을 통해 시험균의 에너지 대사에서 기질이 산화될 때 발생하는 환원력이 전자 수용체 대신 직접 전극을 통해 소비되어 유기물을 연료로 전극을 발생시킬 수 있다는 사실을 확인하였다.

2.3.3. 실험 시에 3>

이 실시예에서는 미생물 촉매로서 시험균 IR-1을 사용하고 연료로서 수소를 사용하여 도 1에 제시한 형태의 연료 전지의 전류 생산성을 시험하였다. 연료 전지를 구성하는 각종 물리적인 조건은 실시예 2와 동일하였다.

양극과 음극의 전극으로서 유효 표면적 6.78 cm^2 의 탄소 막대(직경 8 mm, 길이 25 mm)를 사용하였다. 연료 전지 자체의 저항은 55 $\text{k}\Omega$ 이었고, 암페어미터의 저항은 10 Ω 미만이었다.

이와 같이 준비된 연료 전지의 음극 부위에 ℓ 당 약 1.4 g의 시험균 50 mL 채워넣고 혐기 환경을 유지하였다. 시험균은 30 mM의 젖산염을 함유하는 인산염 완충액 기본 배지에서 48 시간 동안 호기적으로 배양시킨 후에 원심분리하여 수확하였다. 50 mM의 인산염 완충액으로 2회 세척하여 100 mM 염화칼륨을 함유하는 100 mM의 인산염 완충액에 현탁하여 실험에 사용하였다. 이상과 같이 준비된 연료 전지에 가스 정제 오븐을 통과시켜 산소를 완전히 제거시킨 수소를 주입하기 시작하고, 이때 발생하는 전류의 양을 기록계를 이용하여 측정하였다. 도 5에서 보는 바와 같이, 발생된 최대 전류량은 173 μA 였다.

실시예 4>

도 1에 제시한 형태의 연료 전지에 미생물 촉매로서 IR-1을 사용하고 연료로서 피루브산을 이용하여 전류 생산성을 시험하였다. 연료 전지를 구성하는 각종 물리적인 조건은 실시예 2와 동일하였다.

양극과 음극의 전극으로서 유효 표면적 6.78 cm^2 의 탄소 막대(직경 8 mm, 길이 25 mm)를 사용하였다. 연료 전지 자체의 저항은 55 $\text{k}\Omega$ 이었고, 암페어미터의 저항은 10 Ω 미만이었다. 이와 같이 준비된 연료 전지의 음극 부위에 ℓ 당 약 0.2 g의 시험균 50 mL 채워넣고 혐기 환경을 유지하였다. 시험균은 30 mM의 젖산염을 함유하는 인산염 완충액 기본 배지에서 48 시간 동안 호기적으로 배양시킨 후에 원심 분리하여 수확하였다. 50 mM의 인산염 완충액으로 2회 세척하여 100 mM 염화칼륨을 함유하는 100 mM의 인산염 완충액에 현탁하여 실험에 사용하였다. 이상과 같이 준비된 연료 전지에 피루브산을 주입하기 시작하고, 이때 발생하는 전류의 양을 기록계를 이용하여 측정하였다. 도 6에서 보는 바와 같이, 발생된 최대 전류량은 50 μA 였다.

실시예 5>

도 2에 이온을 환원하는 성질을 이용하여 분리한 세균 AJ-2(상기 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 유전자은행에 1996년 7월 24일자로 등록하고 수탁번호 KCTC 8752P를 부여받음)를 미생물 촉매로서 이용하고 연료로서 각각 아세트산염, 수소, 시트르산염을 사용할 때 발생하는 전류량을 측정하여 비교하였다. 연료 전지를 구성하는 각종 물리적인 조건은 실시예 2와 동일하게 하였다.

양극과 음극의 전극으로서 유효 표면적 6.78 cm^2 의 탄소 막대(직경 8 mm, 길이 25 mm)를 사용하였다. 연료 전지 자체의 저항은 55 $\text{k}\Omega$ 이었고 암페어미터의 저항은 10 Ω 미만이었다. 이상과 같이 준비된 각각의 연료 전지의 음극 부위에 균체 농도가 ℓ 당 약 2g인 3가지의 시험균 현탁액 각각 50 mL 를 채워넣고 혐기 환경을 유지하였다. 각 시험균은 30 mM의 시트르산염을 포함하는 인산염 완충액 기본 배지에서 48시간 동안 혐기적으로 배양한 후에 원심 분리에 의해 수확하였다. 이를 50 mM의 인산염 완충액으로 2회 세척하고 100 mM 염화칼륨을 함유하는 100 mM의 인산염 완충액에 현탁하여 실험에 사용하였다. 이상과 같이 준비된 연료 전지에 아세트산염, 가스 정제 오븐을 통과시켜 산소를 완전히 제거시킨 수소 및 시트르산염을 각각 주입하기 시작하고 이때 발생하는 전류의 양을 기록계를 이용하여 측정하였다. 도 7에서 보는 바와 같이, 아세트산염이나 수소를 첨가하였을 때는 전류계의 변화를 관찰할 수 없었으나 시트르산염을 첨가한 직후에 전류가 발생하기 시작하였다. 이는 AJ-2가 시트르산염을 산화시킬 때 발생하는 환원력이 전극을 통해 직접 소비될 수 있다는 사실을 보여주는 것이다.

실시예 6>

이 실시예에서는 도 2와 같은 연료 전지에 시험균으로서 IR-1을 사용하고 연료로서 젖산염을 사용한 경우의 전류의 생산성을 시험하였다. 연료 전지를 구성하는 각종 물리적인 조건은 실시예 2와 동일하게 하였다.

양극과 음극의 전극으로서 각각 유효 표면적 846 cm^2 및 유효 표면적 1,175 cm^2 의 흑연부직포를 사용하였다. 연료 전지 자체의 저항은 15 $\text{k}\Omega$ 이었고 암페어미터의 저항은 10 Ω 미만이었다. 이상과 같이 준비된 연료 전지의 음극 부위에 균체 농도가 ℓ 당 약 0.7 g인 시험균 현탁액을 혐기적으로 부가하여 전류의 발생량을 연속적으로 측정하였다. 시험균은 실시예 2와 같은 방법으로 준비하였으며 전극에 고정하지 않고 사용하였다. 도 8에서 보는 바와 같이, 연료 전지에서 발생된 전류량은 최대 0.18 mA 로 측정되었고 전압은 0.42 V로 측정되었다. 연료 전지에 첨가한 젖산염의 약 36%가 아세트산염으로 산화되었으나, 전자 수용체를 첨가하지 않고 연료 전지와 동일한 조건으로 배양한 대조군에서는 약 5%의 젖산염이 아세트산염으로 산화되었다. 이 실험을 통해 시험균의 에너지 대사에서 발생하는 환원력이 전자 수용체 대신 전극을 통해 직접 소비될 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

실시예 7>

이 실시예는 실시예 6과 동일한 방법으로 실시하되 사용되는 균체량과 음극의 면적에 변화를 주었다. 음극의 유효 표면적을 4,700 cm^2 로 증가시켰고, 균체량은 1.5배 증가시켜 실시하였다. 도 9에서 보는 바와 같이 연료 전지에서 생산되는 최대 전류량은 1.1 mA 로 측정되었고 전압은 0.41 V로 측정되었다. 연료 전지의 연료로서 첨가된 젖산염은 약 60%가 아세트산염으로 산화되었다. 이 실험으로 부터 음극의 유효 표면적이 생물 연료 전지의 효율을 증가시키는데 매우 중요한 인자로 작용함을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명에 따른 생물 연료 전지는 전극을 전자 수용체로 이용함으로써 미생물의 에너지 대사에서 발생하는 환원력을 균체 생산에 이용하지 않고 전극을 통해 직접 소비한다. 따라서, 폐수가 본 발명의 금속성 환원 세균 생물 연료 전지의 연료로서 이용될 경우, 오니의 발생량과 메탄 생산량이 감소되고 유기물의 분해 효율이 증가될 수 있다.

청구의 범위

청구항 1.

양극과 음극, 이들 양극 및 음극의 전도 매체, 이들 두 극 사이의 이온 교환막 및 음극 부위의 미생물 촉매로 이루어진 생물 연료 전지에 있어서, 연료 촉매로서 금속성 환원성 세균을 사용함을 특징으로 하는 생물 연료 전지.

제1항 2.

제1항에 있어서, 상기 미생물 촉매가 중온성 또는 고온성 세균 또는 이들 각각의 혼합체임을 특징으로 하는 생물 연료 전지.

제1항 3.

제1항에 있어서, 상기 미생물 촉매가 IR-1(KCTC 8753P) 또는 AJ-2(KCTC 8752P)임을 특징으로 하는 생물 연료 전지.

제1항 4.

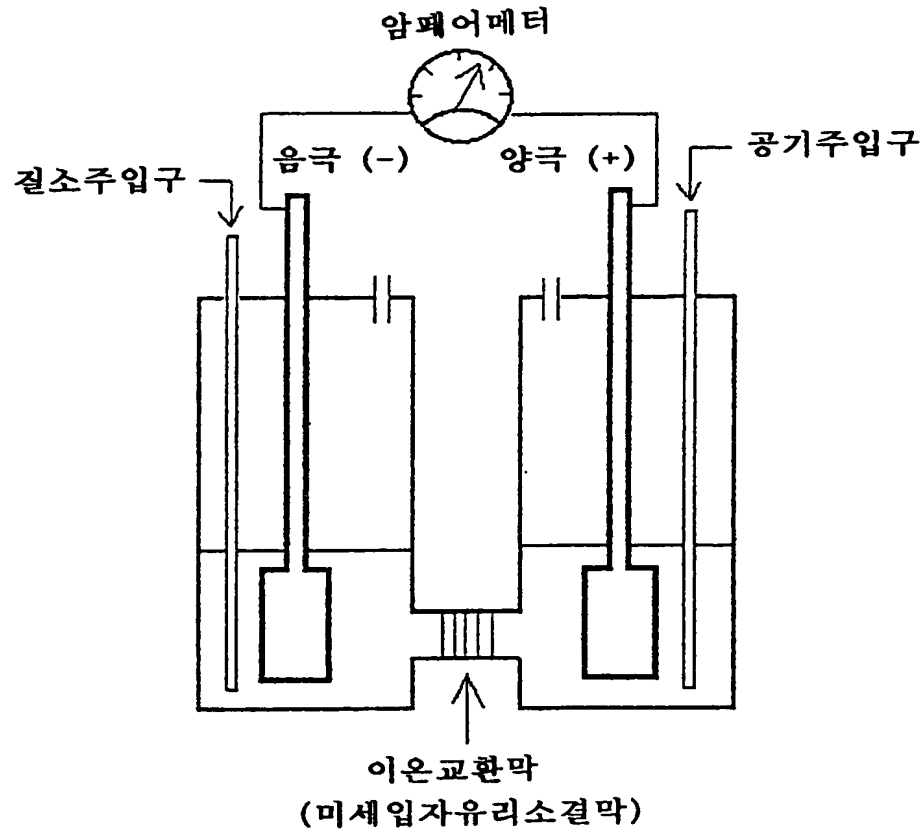
제1항에 있어서, 유기 물질을 연료로 이용함을 특징으로 하는 생물 연료 전지.

제1항 5.

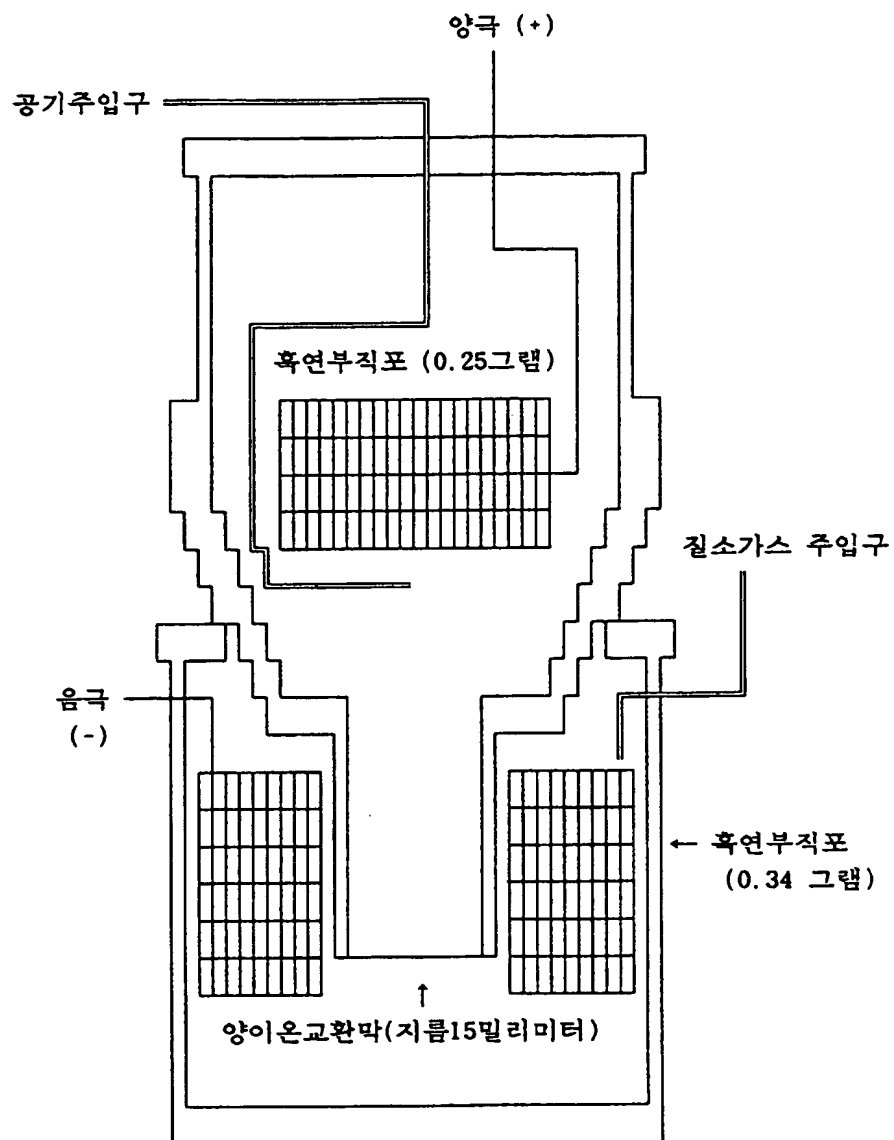
제1항에 있어서, 무기 물질을 연료로 이용함을 특징으로 하는 생물 연료 전지.

도면

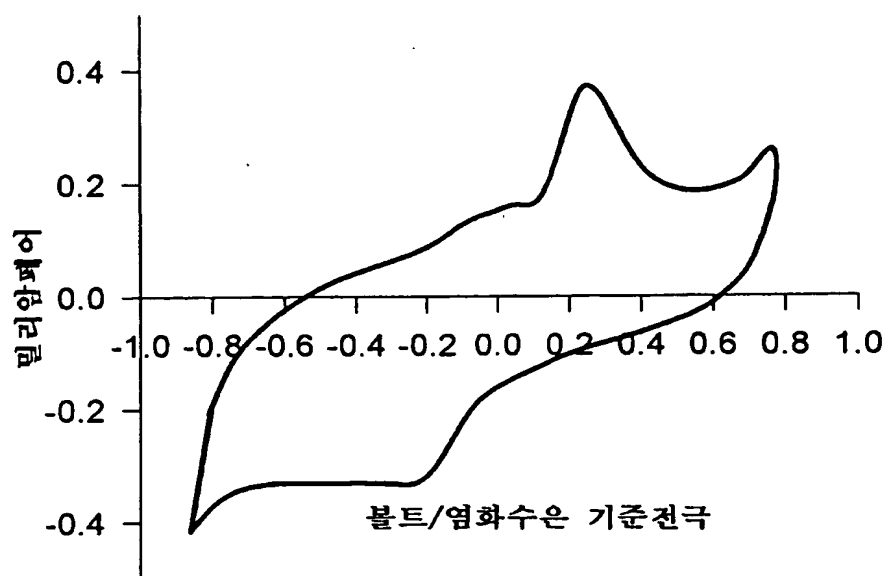
도면 1



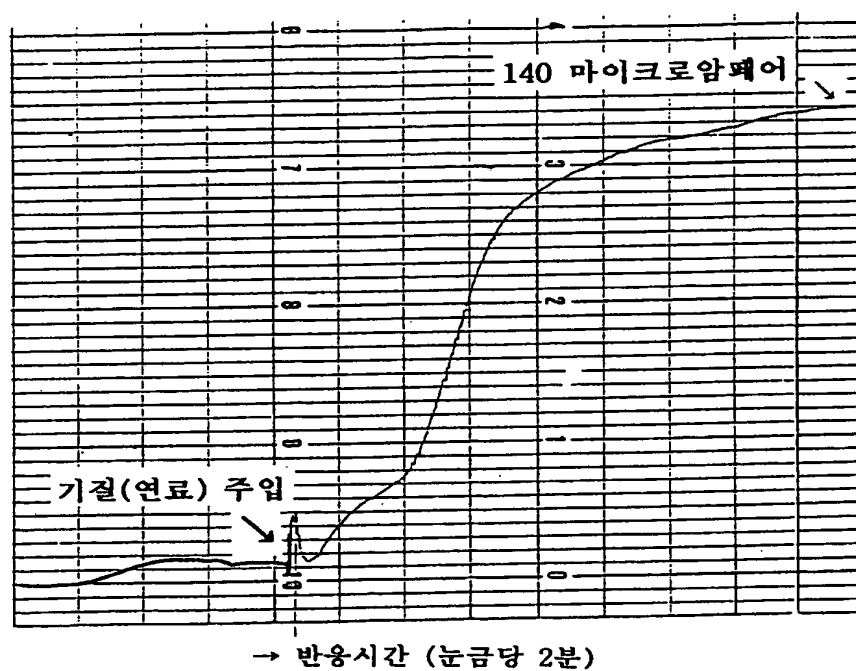
도면 2



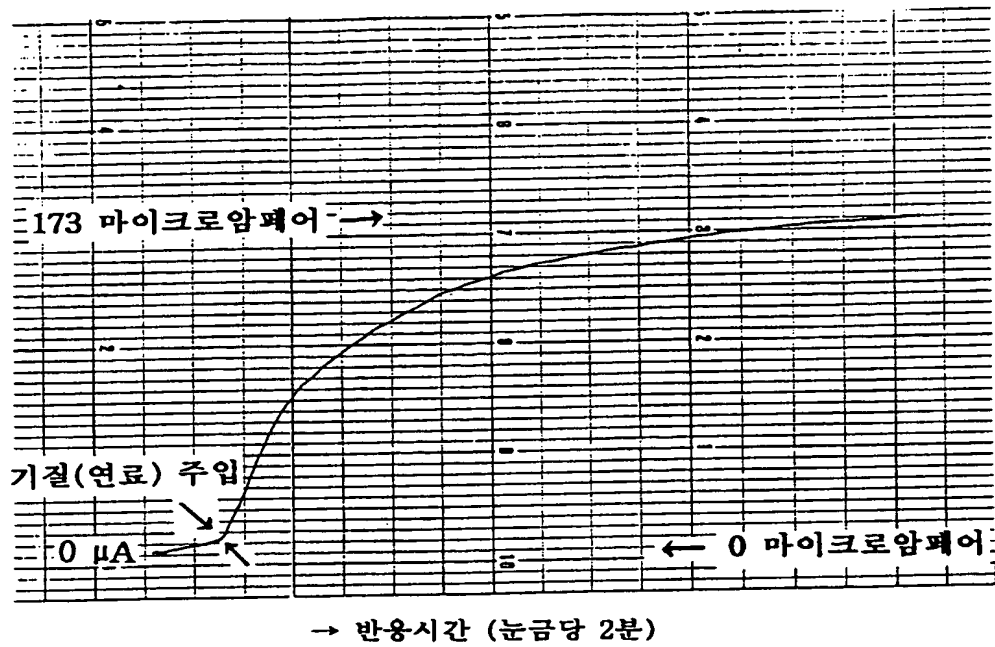
도면 3



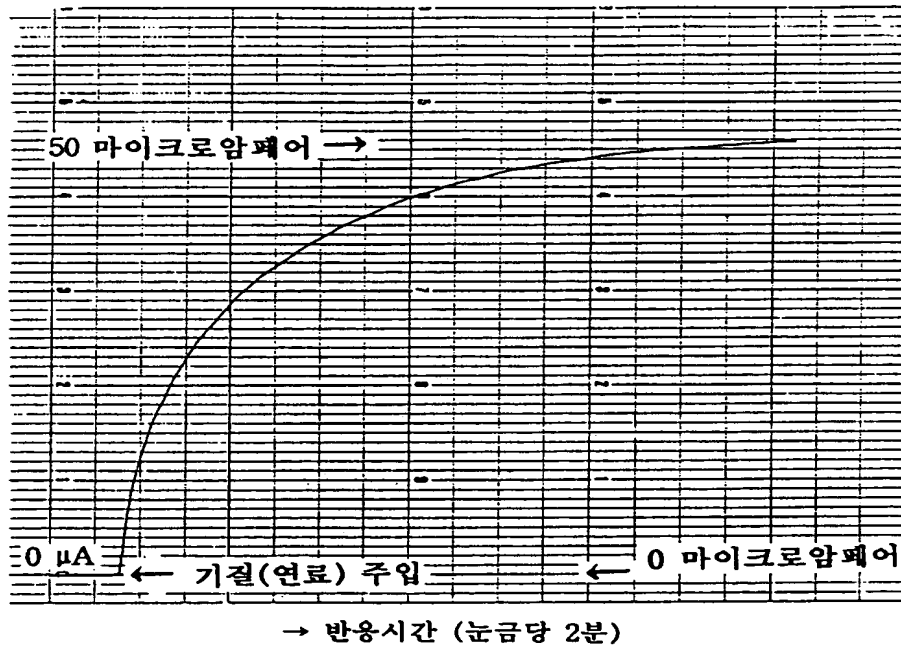
도면 4



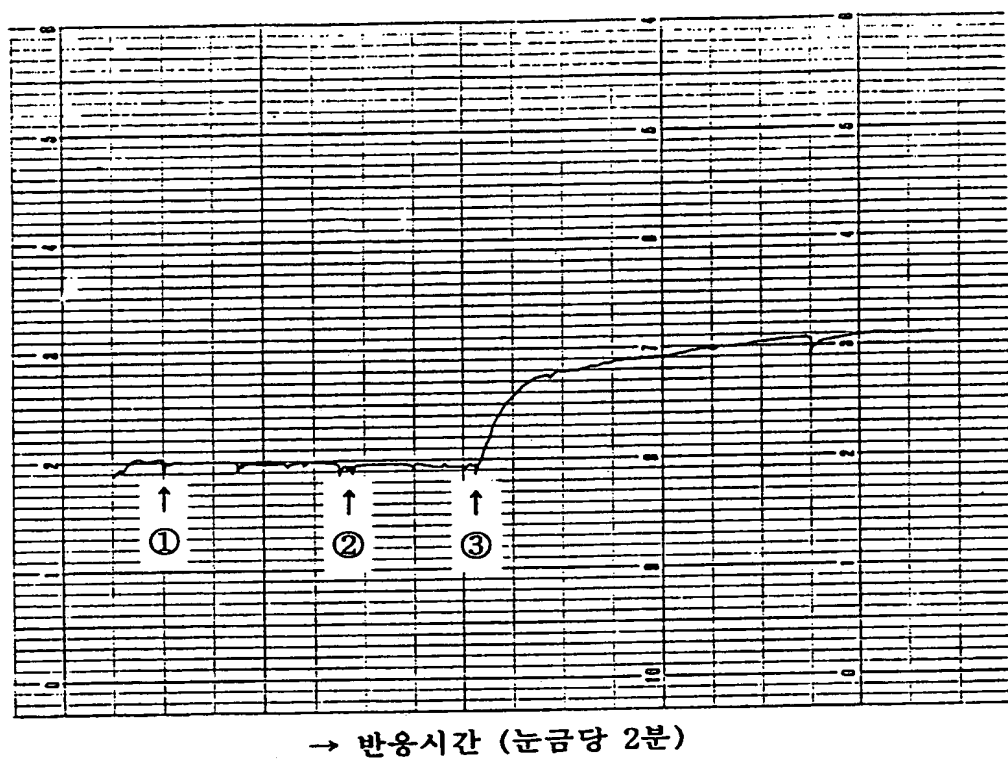
도면 5



도면 6

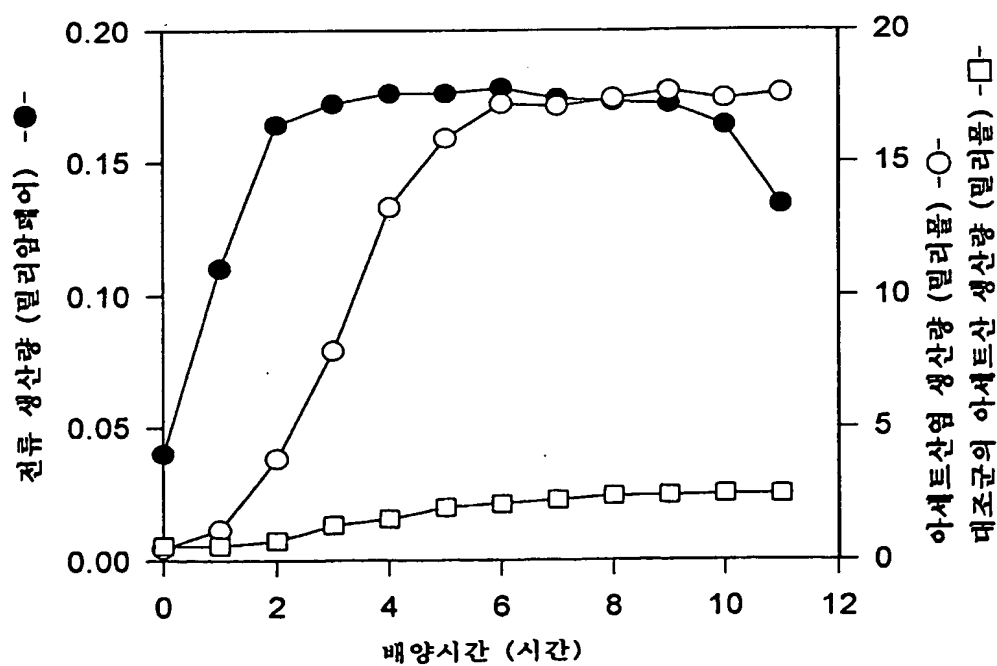


도면 7

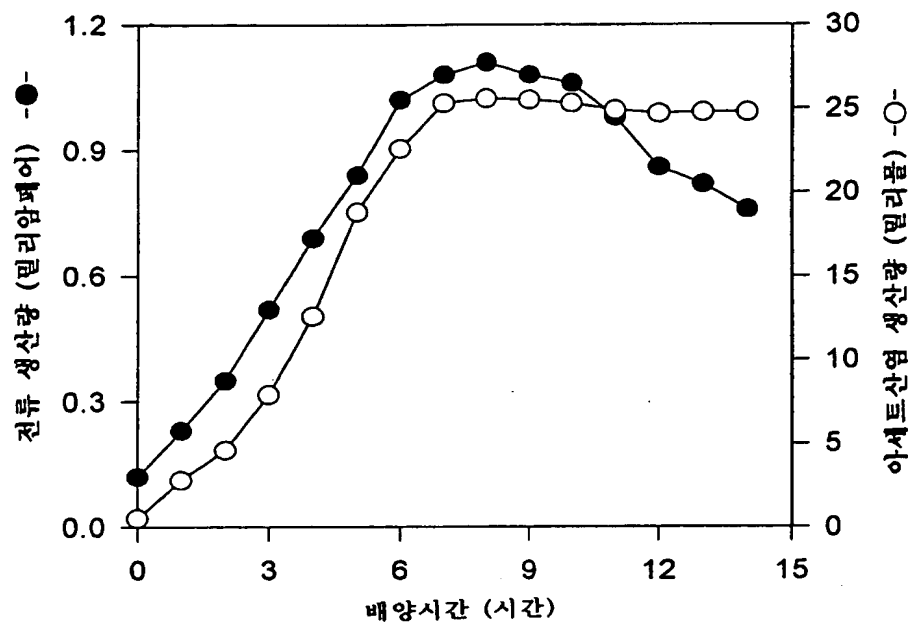


- ① 아세트산 주입
- ② 수소 주입
- ③ 시트르산 주입

도면 8



도면 9



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.